C-Kit Ground Pro ND
[Neutron Diffraction Kit]

取扱説明書

2022 年 10 月

株式会社コンフォーカルサイエンス

目次

1. はじめに 4
   1.1. 概要 4
   1.2. 本キットの特長 5
2. 本キットで使用する結晶作成法の原理 6
   2.1. カウンターディフュージョン法 (CD 法) 6
   2.2. 透析法 8
3. 実験操作マニュアル 9
   3.1. バッチ法による結晶作成のセットアップ 9
      3.1.1. ご用意いただくもの （結晶化 1 条件、キャピラリー1 本分として） 9
      3.1.2. 事前準備 (充填前) 9
      3.1.3. 充填作業 9
   3.2. CD 法による結晶作成のセットアップ 12
      3.2.1. ご用意いただくもの （結晶化 1 条件、キャピラリー1 本分として） 12
      3.2.2. ゲルチューブの pre-soaking (数日前) 13
      3.2.3. 事前準備 (充填前) 14
      3.2.4. 充填作業 14
   3.3. 透析法による結晶作成のセットアップ 18
      3.3.1. ご用意いただくもの （結晶化 1 条件、LCDM 容器 1 本分として） 18
      3.3.2. LCDM 容器の pre-soaking (数日前) 19
      3.3.3. 事前準備 (充填前) 19
      3.3.4. 充填作業 20
   3.4. LCDM 容器からの結晶取出し 22
      3.4.1. ハーベスト溶液の準備 22
      3.4.2. LCDM 容器の分解 22
      3.4.3. 結晶の取出し 22
4. 技術資料 24

4.1. 溶液成分濃度の時間経過 24
4.1.1. CD 法 24
4.1.2. 透析法 24
4.2. 大型結晶作成に必要な考え方 26
4.2.1. 必要試料量 26
4.2.2. 結晶の個数 26
4.2.3. 条件検討の考え方 27
4.2.4. 複数の結晶化試薬成分があるとき 28
4.2.5. 濃度依存性が逆のケース 29
4.2.6. タンパク質試料の品質 29

キット内容 (CRT101-2)

品名	個数	説明
キャピラリー (φ0.29 mm×29 mm)	100	バッチ法結晶化で使用。
キャピラリー (φ0.5 mm×47 mm)	15	CD 法結晶化で使用。ゲルチューブは予備品 3 個を含みます。
ゲルチューブ (φ1.0 mm×1 cm)	18	
LCDM 容器 (ガラス)	6	透析法による大型結晶作成で使用。タンパク質のロスをなくすための透析膜は MWCO 6,000-8,000。
LCDM 容器 (石英)	2	
C-Cap	10	
シリコンチューブ (φ1.0 mm×50 cm)	1	バッチ法、CD 法の充填で、試料を吸引する場合に使います。
極細ゲルローディングチップ	9	LCDM 容器への試料充填に使います。
シーリングコンパウンド	1	キャピラリー、LCDM 容器の封止に使います。
ラウンドチューブ (5 mL)	30	充填したキャピラリー、LCDM 容器の保管用です。

使用上の注意

- 本キットは試験研究用です。目的以外には使用しないで下さい。
- キャピラリーはゲルチューブ装着時など、破損する恐れがあります。けがをしないようご注意下さい。
- 本商品は宇宙航空研究開発機構 (JAXA) の技術開発成果を、許諾を受けて使用しています。特許第 4354457 号

1. はじめに

1.1. 概要

C-Kit Ground Pro ND は宇宙実験のノウハウから生まれた、中性子回折実験向けのタンパク質大型結晶作成用キットです。バッチ法で結晶が少数できる結晶化試薬濃度を詳細に検討した後、カウンターディフュージョン法 (CD 法)[1)]で小規模スケールの結晶化を確認し、次いで透析膜付きの大型結晶化容器 (LCDM 容器) を用いた透析法[2)]で大型結晶作成を試みます。合理的に結晶化条件を絞り込むことにより、より少ないタンパク質試料で大型結晶の作成を目指します。論理的かつ低コストな実験手段をご提供します。

本キットで使用する CD 法は、宇宙航空研究開発機構 (JAXA) の業務委託により株式会社コンフォーカルサイエンスらが共同で技術開発した方法です[3)]。JAXA より許諾を受けて使用しています[4)]。また当社では、X 線回折実験のためのタンパク質結晶の作成ができる実験キット(**C-Kit Ground Pro XRD**、CRT101-1、http://www.confsci.co.jp/images/C-kit%20Ground%20Pro_220908E.pdf)や、国際宇宙ステーションの微小重力環境を利用した高品質結晶作成実験向けの **C-Kit Space Pro Kit** シリーズも販売しております。併せてご利用ください。

1) García-Ruiz, J.M.; Moreno, A. Investigations on protein crystal growth by the gel acupuncture method. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol. Commun.* 1994, D50, 484–490

2) Takahashi, S.; Koga, M.; Yan, B.; Furubayashi, N.; Kamo, M.; Inaka, K.; Tanaka, H. JCB-SGT crystallization devices applicable to PCG experiments and their crystallization conditions. *Int. J. Microgravity Sci. Appl.* 2019, 36, 360107

3) Tanaka, H.; Inaka, K.; Sugiyama, S.; Takahashi, S.; Sano, S.; Sato, M.; Yoshitomi, S. A simplified counter diffusion method combined with a 1D simulation program for optimizing crystallization conditions. *J. Synchrotron Rad.* 2004, 11, 45–48.

4) 吉崎ら 生体高分子結晶生成装置及び方法 特許第 4354457 号 2004.

1.2. 本キットの特長

- 少ないタンパク質試料量： 標準の試料量は以下の通りです：
  バッチ法： キャピラリー1 本当たり 1.3 μL
  CD 法： キャピラリー1 本当たり 8 μL
  透析法： LCDM 容器 1 個あたり 27 μL です。
- 簡単な充填： バッチ法、CD 法、透析法、いずれの方法でも、充填・セットアップが簡単です。
- 高い再現性・信頼性： CD 法、透析法とも宇宙航空研究開発機構(JAXA)ならびに有人宇宙システム株式会社(JAMSS)が行っている宇宙実験で使用している方法です。高い再現性、信頼性は実証済みです。特に CD 法は 2002 年以降、のべ 500 種以上のタンパク質結晶化宇宙実験に使用実績があります。
- 長期安定性： 生成した結晶は CD 法キャピラリー中ならびに LCDM 容器中で、長期にわたり安定です。
- 最適条件の検討： CD 法、透析法では 1 次元拡散シミュレーションプログラム（別売）でタンパク質試料と結晶化試薬の拡散の時間経過を推定可能です。結晶化の最適条件の検討に利用できます。（C-Kit Pro Advanced Tool、http://www.confsci.co.jp/images/C-Kit%20Pro%20Advanced%20Tool_2208_2.pdf）

2. 本キットで使用する結晶作成法の原理

本キットでは、バッチ法、カウンターディフュージョン法ならびに透析法の容器を提供しています。バッチ法の結晶化原理は単純ですので、以下では他の方法について説明します。

2.1. カウンターディフュージョン法 (CD 法)

本キットでは CD 法の一つである Gel Tube (GT) 法の結晶化容器を提供します。この方法による結晶生成のしくみを簡単に説明したものが図 2.1.です。

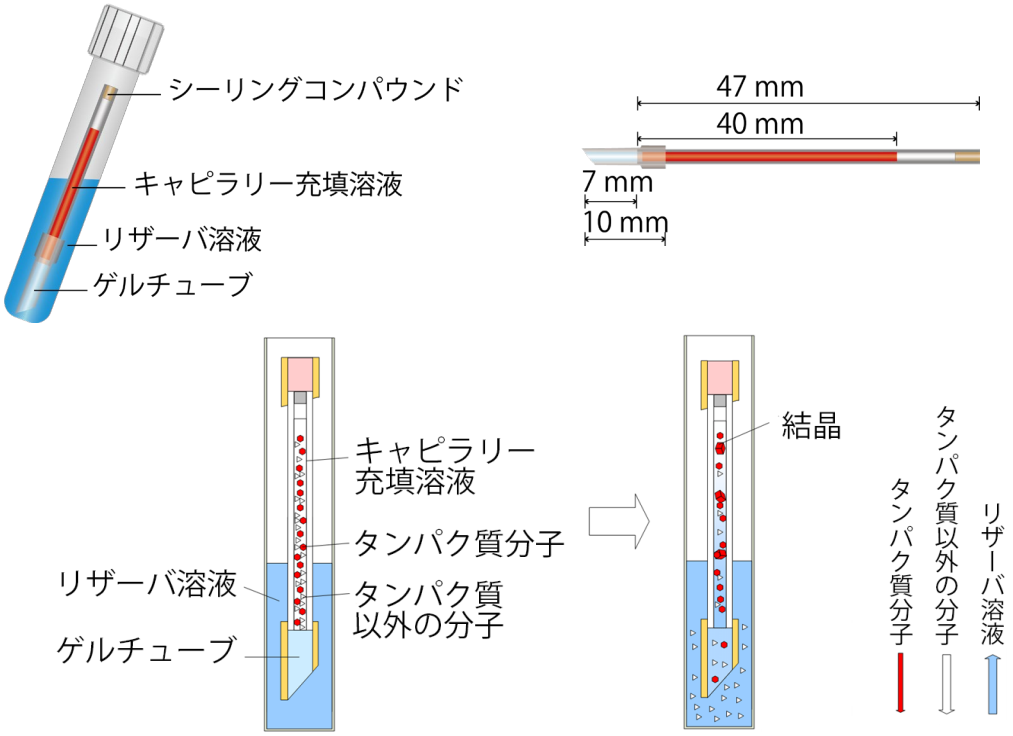

図 2.1. CD 法説明図
上：主要構成品の模式図。下：キャピラリー充填溶液とリザーバ溶液の相互拡散（カウンターディフュージョン）により結晶が生成します。

タンパク質試料を充填したキャピラリーの先端に、ゲルチューブと呼ぶアガロースゲルを充填してあるシリコンチューブを接続します。ゲルチューブを介して、キャピラリー内にリザーバ溶液成分が徐々に拡散するため、キャピラリー内にリザーバ溶液成分の濃度勾配ができます。またキャピラリー充填溶液内のタンパク質試料や共存する他の成分も、徐々にキャピラリーの外へ拡散します。その結果、キャピラリー内には、リザーバ溶液由来の結晶化試薬と、キャピラリー充填溶液由来のタンパク質試料の濃度の組合せによって、連続的で広範な結晶化条件が生まれます。結晶化に適した

濃度組合せ条件が整った場所で結晶生成が始まります (セルフサーチングメカニズム)。結晶化試薬とタンパク質試料の拡散時間経過を把握することは、この結晶化方法において重要です[3)]。詳しくは「4.1. 溶液成分濃度の時間経過」で説明します。

2.2. 透析法

本キットではもう一つの結晶化方法として内径の大きなキャピラリーを用いた透析法の結晶化容器(LCDM 容器)を提供します。LCDM 容器の標準的なコンフィギュレーションと結晶生成のしくみを簡単に説明したものが図 2.2.です。

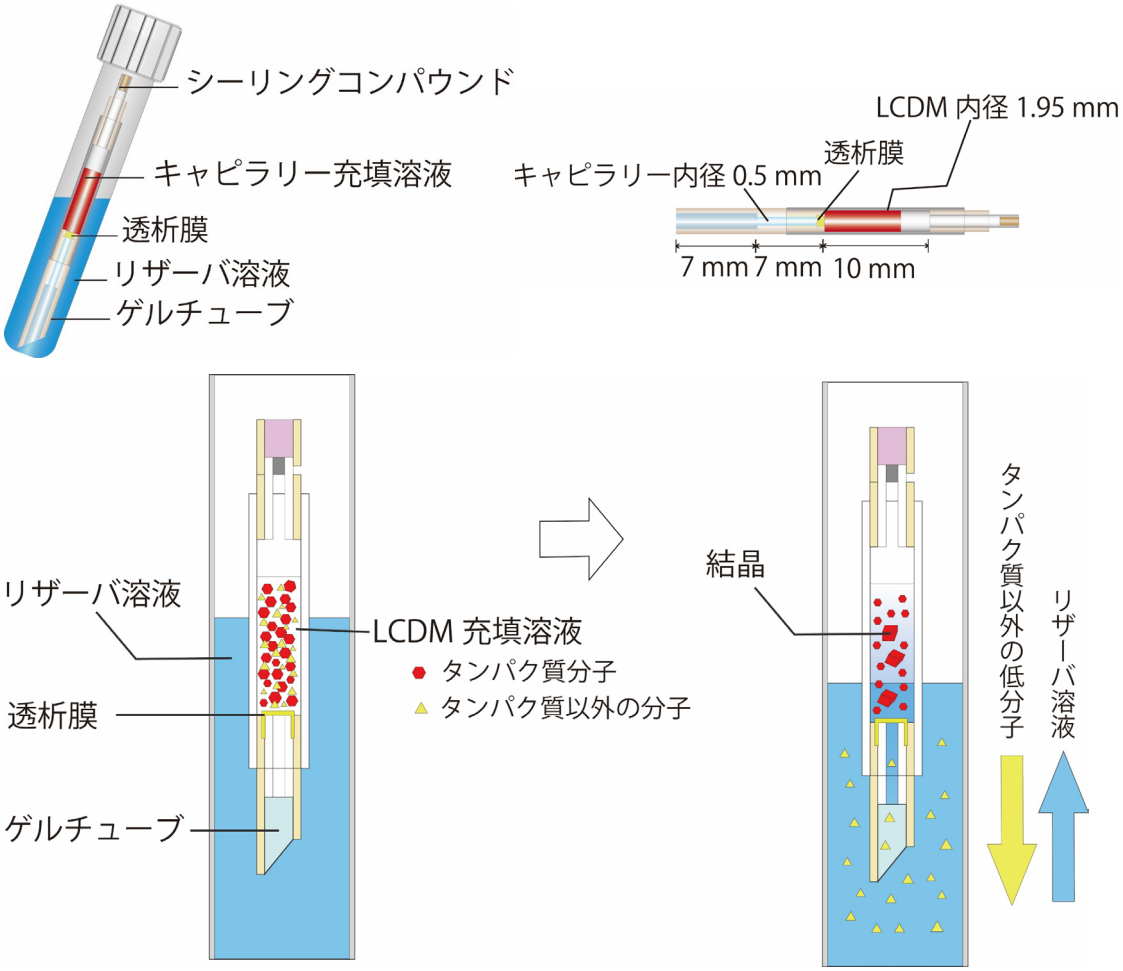

図 2.2. LCDM 容器説明図
左上:主要構成品の模式図。右上:LCDM 詳細図。下:リザーバ溶液がキャピラリー充填溶液内へ透析膜を介して拡散し、結晶が生成します。

タンパク質試料を充填した大内径キャピラリーの一端に透析膜が配置されています。更にこの先に、ゲルチューブが接続されています。ゲルチューブ、透析膜を介して、リザーバ溶液成分がキャピラリー内に徐々に拡散し、結晶化に適した濃度になったところで結晶生成が始まります。結晶化試薬の拡散時間経過を把握することは、この結晶化方法において重要です。詳しくは「4.1. 溶液成分濃度の時間経過」で説明します。

3. 実験操作マニュアル

3.1. バッチ法による結晶作成のセットアップ

3.1.1. ご用意いただくもの （結晶化 1 条件、キャピラリー1 本分として）

試料・溶液	容量	説明
キャピラリー充填溶液	数 μL	キャピラリーに充填する溶液です。タンパク質試料に所定濃度の結晶化試薬成分を加えた溶液です。 内径 0.29 mm ですので、必要量は試料長 20 mm の場合、1.3 μL になります。充填作業のやり易さを考慮し、やや多めの準備が望ましいです。

キットから使うもの	数量	説明
キャピラリー (φ0.29 mm×29 mm)	1	
シーリングコンパウンド	1	キャピラリーの両端を封止するために使用します。
シリコンチューブ	1	キャピラリーに溶液を充填する際、吸引する必要があれば使用します
ラウンドチューブ (5 mL)	1	充填したキャピラリーの結晶化観察用です

3.1.2. 事前準備 (充填前)

1. キャピラリー充填溶液の準備

充填に必要な量のタンパク質試料溶液を準備します。所定濃度の結晶化試薬やリガンドなどを混合する必要がある場合には、あらかじめ混合し、キャピラリー充填溶液とします。

3.1.3. 充填作業

1. 1. キャピラリー充填溶液の充填

キャピラリーの一端をキャピラリー充填溶液に浸し、毛細管現象で 10～20 mm の長さを吸い上げます。溶液の吸い上げが遅い場合は、キャピラリーを寝かせるとよ

いでしょう（図 3.1.）。溶液が入りにくい場合には、シリコンチューブを取り付け、マイクロピペットで吸引する方法もあります（図 3.2.）。

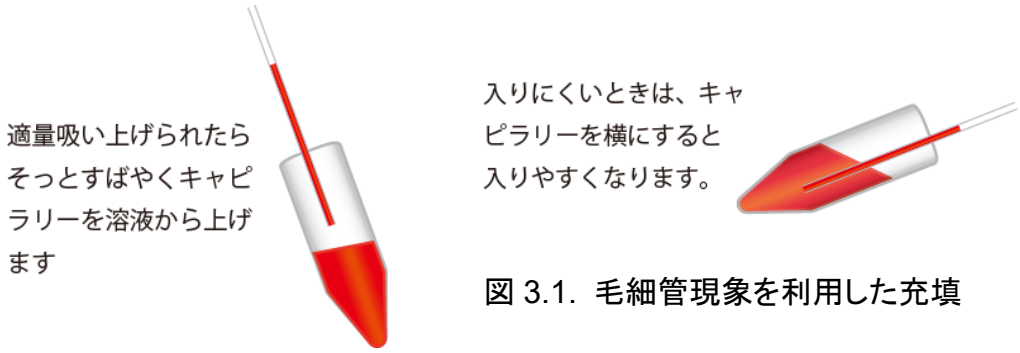

図 3.1. 毛細管現象を利用した充填

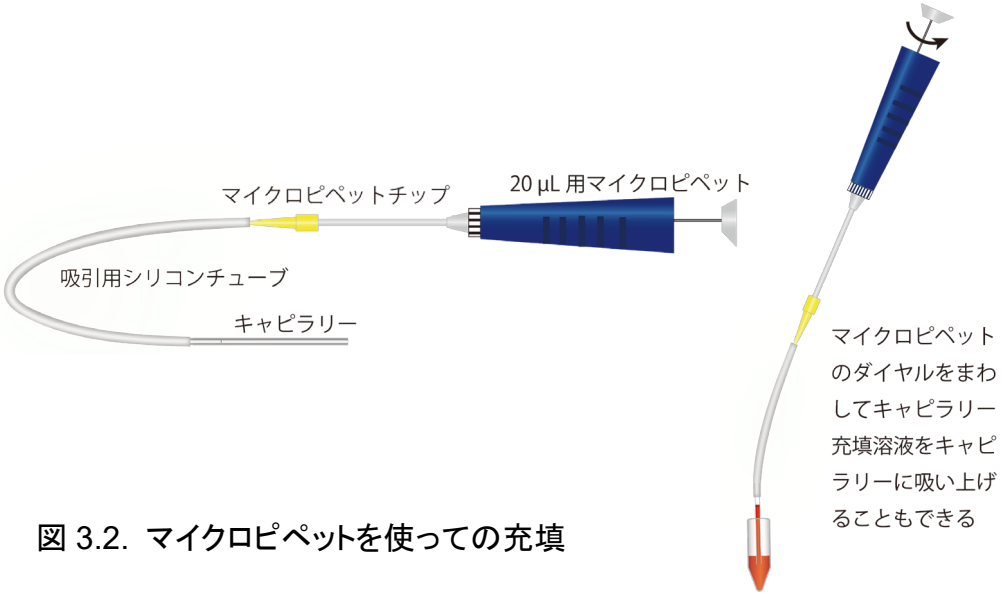

図 3.2. マイクロピペットを使っての充填

溶液がシーリングコンパウンドに接すると、そこから結晶が生成する場合があります。これを防ぐため、キャピラリーを手に持ったままゆっくり傾け、溶液をキャピラリーの真ん中に移動させます。

2. キャピラリーの封止

キャピラリーの両端をシーリングコンパウンドでシールします。この際、シーリングコンパウンドをキャピラリー中に押し込むことが重要です。逆さにしたシーリングコンパウンドに、下からキャ

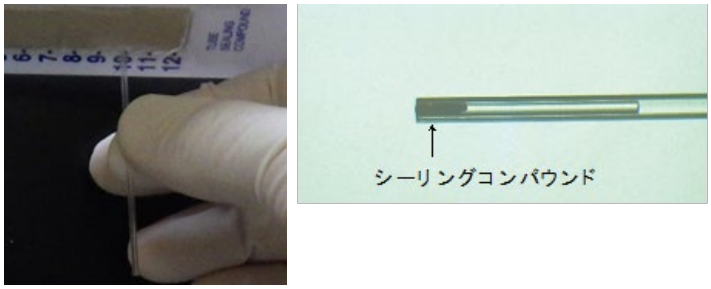

図 3.3. キャピラリーの封止

ピラリーの上端を突き立てて、容器の底の板に押し付ける様にすることで、キャピラリー内に押し込み 2、3 回左右に回してから引き抜きます(図 3.3.)。シーリングコンパウンドがキャピラリー上端に 2 ㎜くらい詰まるまでこれを繰り返します。

3. キャピラリーの保管

キャピラリーをラウンドチューブに静かに入れ蓋をします。所定の温度環境に静置します。

3.2. CD 法による結晶作成のセットアップ

3.2.1. ご用意いただくもの （結晶化 1 条件、キャピラリー1 本分として）

試料・溶液	容量	説明
キャピラリー充填溶液	6～8 μL	キャピラリーに充填する溶液です。タンパク質試料、或いはタンパク質試料にリガンドや結晶化試薬成分などを加えた溶液です。 内径 0.5 mm ですので、必要量は試料長 30 mm の場合、6 μL、40 mm の場合、8 μL になります。充填作業のやり易さを考慮し、やや多めの準備が望ましいです。
リザーバ溶液	1 mL 程度	ゲルチューブを介してキャピラリー中に拡散させ、タンパク質を結晶化する溶液です。結晶化試薬成分、バッファ成分だけでなく、必要に応じてリガンド成分などを加えます。
ゲルチューブ浸漬溶液	4 mL 程度	ゲルチューブを予め浸漬しておく溶液です。早めの結晶生成を期待するときには、リザーバ溶液と同組成の溶液とします。緩和な条件での結晶化では、バッファ成分だけで十分です。ゲルチューブ(長さ 10 mm）が浸る液量が必要です。
シード溶液	数 μL	シーディングを行う場合に用意します。

キットから使うもの	数量	説明
キャピラリー (φ0.5 mm×47 mm)	1	試料を充填するときの目標の位置に、油性サインペンでマークをつけておきます。
ゲルチューブ (φ1.0 mm×1 cm)	1	本キット中のゲルチューブは、0.04% NaN_3 溶液に浸漬されています。
シーリングコンパウンド	1	キャピラリーの上端を封止するために使用します。
シリコンチューブ	1	キャピラリーに溶液を充填する際、吸引する必要があれば使用します。
ラウンドチューブ (5 mL)	1	充填したキャピラリーの結晶化観察用です。

ご準備いただきたい器材	数量	説明
蓋付容器	1	高さ 40 mm、容量 5 mL 程度の容器。ゲルチューブを予め浸漬する際に使います。
マイクロピペット／チップ各種	各 1	リザーバ溶液調製、充填用。
マイクロピペット／チップ（20～100 μL 用）	各 1	キャピラリーに溶液を充填する際、吸引する必要があるときに使用します。
サージカルブレード (またはカッター)	1	ゲルチューブ下端カット用。刃先が鋭利なこと。
油性サインペン	1	キャピラリーに目安線を記入する際に使います。

3.2.2. ゲルチューブの pre-soaking (数日前)

1. ゲルチューブ浸漬溶液の準備

C-Kit Ground Pro ND 中のゲルチューブは、0.04% NaN_3 溶液に浸漬した状態です。そのまま結晶化に使用すると、タンパク質試料によっては、塩濃度が低すぎるなどの急激な変化による影響が懸念されます。また、ゲルチューブ中を結晶化試薬が拡散するには時間を要します。そこで早めの結晶生成を期待する場合には、ゲルチューブ浸漬溶液は、リザーバ溶液と同組成の溶液とします。緩和な条件での結晶化では、バッファ成分だけ、またはそれに必要量の結晶化試薬成分を加えた溶液とします。これらいずれかの溶液を、ご準備いただいた蓋つき容器に 4 mL 程度入れ、ゲルチューブを浸漬します。

2. ゲルチューブの浸漬に要する時間

ゲルチューブをゲル浸漬溶液に浸漬したときの塩濃度変化のシミュレーション結果から、ゲルチューブの浸漬日数は、NaCl 溶液で 0.5 日程度、PEG4000 溶液で 4 日程度です。

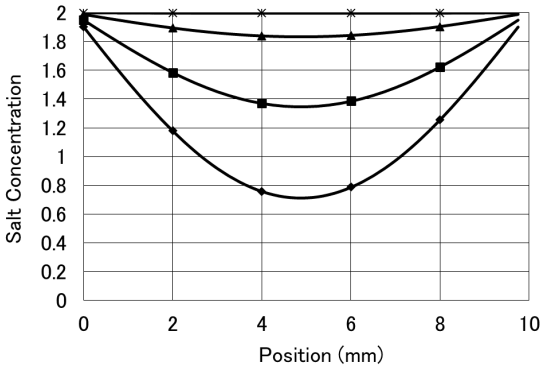

図 3.1. ゲルチューブを 2 M NaCl 溶液に浸漬したときの、内部の NaCl 濃度の時間変化のシミュレーション結果。
横軸はゲルチューブの端からの距離、縦軸は NaCl 濃度。曲線は、下から、0.05、0.1、0.2、0.5 日後の NaCl 濃度を示す。

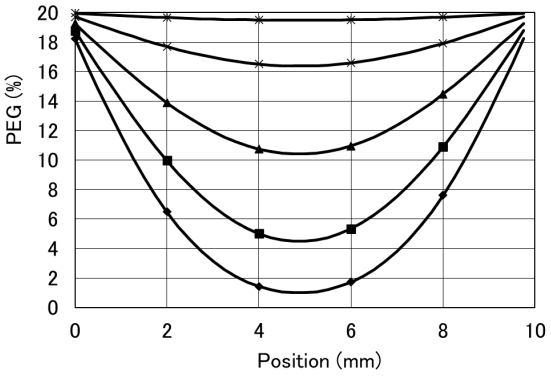

図 3.2. ゲルチューブを 20% PEG4000 溶液に浸漬したときの、内部の PEG4000 濃度の時間変化のシミュレーション結果。
横軸はゲルチューブの端からの距離、縦軸は PEG4000 濃度。曲線は、下から、0.25、0.5、1、2、4 日後の PEG4000 濃度を示す。

3.2.3. 事前準備 (充填前)

1. キャピラリー充填溶液の準備

充填に必要な量のタンパク質試料溶液を準備します。充填時に結晶化試薬やリガンドなどを混合する必要がある場合には、あらかじめ混合してキャピラリー充填溶液とします。

2. 種結晶 (シード) 溶液

ミクロシーディングまたはマクロシーディングを行う場合には、種結晶からそれらを含む種結晶 (シード) 溶液を準備します。

3. リザーバ溶液の準備

必要な量のリザーバ溶液を準備し、0.7 ~ 1 mL 程度をラウンドチューブ (5 mL) に入れます。

4. キャピラリーの目安線

キャピラリーには溶液を充填する際の目安線を油性サインペンでつけます。試料を 40 mm 充填する場合には、端から 40 mm のところにつけます。シーディングを行う場合には、35 と 40 mm の 2 か所に目安線をつけます。

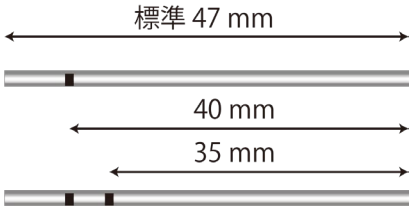

図 3.3. キャピラリーの目安線

3.2.4. 充填作業

1. キャピラリー充填溶液の充填

キャピラリーを目安線が上になるように持ち、充填溶液をキャピラリーの目安線まで（シーディングを行う場合は 35 mm の線まで）充填します。

毛細管現象で、キャピラリーに充填することができる場合は、キャピラリー先端をキャピラリー充填溶液に漬けると、キャピラリー内を溶液が上がってきます。入りにくいときは、キャピラリーを横にすると、入りやすくなります。途中にエアーが入らないように、充填中はキャピラリー充填溶液からキャピラリー先端を上げないように気をつけます。シーディングの場合は、キャピラリー充填溶液を 1 本目の目安線まで充填し、次いでキャピラリー先端をシード溶液に移して、キャピラリー充填溶液が 2 本目の目安線まで来るようにシード溶液を充填します。

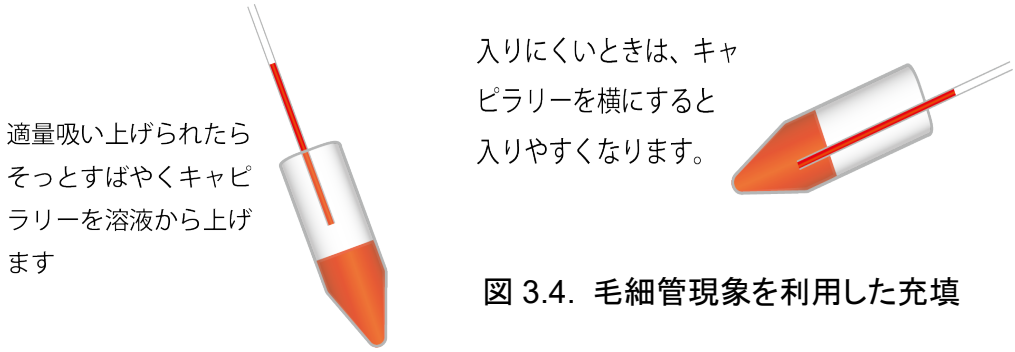

図 3.4. 毛細管現象を利用した充填

毛細管現象では、キャピラリーに容易に充填できない場合もあります。 溶液の性状により、溶液が毛細管現象により上がってこない場合（粘性が高い場合等）や、

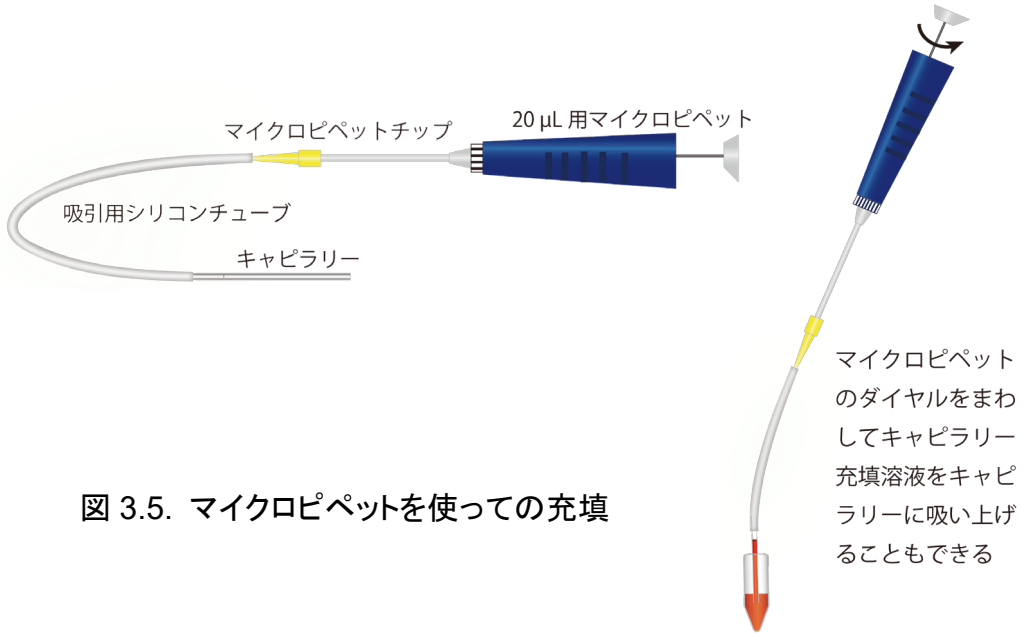

図 3.5. マイクロピペットを使っての充填

逆に、すぐにキャピラリーの先端まで溶液が上がってくる場合（界面活性剤や有機溶媒を含む場合等）があります。その場合には、マイクロピペットを使って、吸引充填します。

まず、20 μL マイクロピペット用チップに吸引用シリコンチューブを装着し、その先端をキャピラリー上端に装着します。次いで、マイクロピペットの目盛りを、充填量に合わせ、キャピラリー下端をキャピラリー充填溶液に入れて吸い上げます。または、マイクロピペットのダイヤルを回して、キャピラリーに溶液を吸い上げます。所定の量を充填したら、吸引用シリコンチューブをつぶさないように注意しながら外します。シーディングの場合は、キャピラリー充填溶液を 1 本目の目安線（35 mm）まで充填し、次いでキャピラリー先端をシード溶液に移して、キャピラリー充填溶液が 2 本目の目安線（40 mm）まで来るように、マイクロピペットのダイヤルを回してシード溶液を吸い上げます。

いずれの方法で充填した場合でも、キャピラリー下端にエアーを入れないために、充填後直ちに下記の方法でキャピラリー上端を封止します。

2. キャピラリーの封止

逆さにしたシーリングコンパウンドに、下からキャピラリーの上端を突き立てて容器の底の板に押し付け、2、3 回左右に回してから引き抜きます。シーリングコンパウンドがキャピラリー上端に 2 ㎜くらい詰まるまでこれを繰り返します。右図のように、キャピラリーの下端から、充填液が少しはみ出しているのが観察できます。

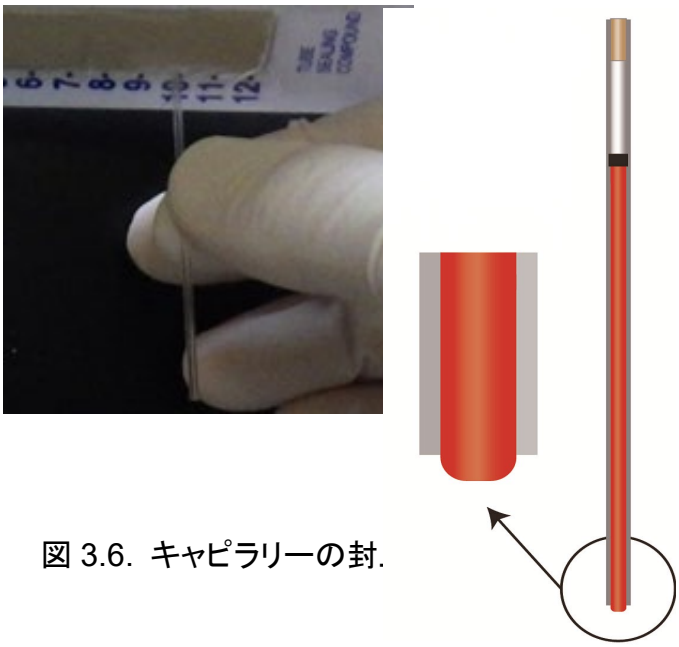

図 3.6. キャピラリーの封.

キャピラリー充填溶液の充填時に、キャピラリー下端に若干エアーが入ってしまう場合があります。エアーはリザーバ溶液の拡散を妨げるので、追い出しておく必要があります。上端からシーリングコンパウンドを更に多量につめて、下端のエアーを押し出し、キャピラリー下端から充填溶液が少し盛り出ている状態にします。

3. ゲルチューブの取付け

キャピラリー下端にゲルチューブを取付けます。キャピラリーとゲルチューブの間にエアーが入らないよう、ゲルチューブのキャピラリー装着端に、ゲル浸漬溶液を少しのせてから、キャピラリーを装着します。ゲルチューブ下端からは、中のゲルが少量押し出されます。次いで、ゲルチューブの下端を鋭利なブレードなどで斜めにカットします。斜めにカットすることで、ゲルチューブ先端が、ラウンドチューブ底面に密着しても、リザーバ溶液の拡散が妨げられなくなります

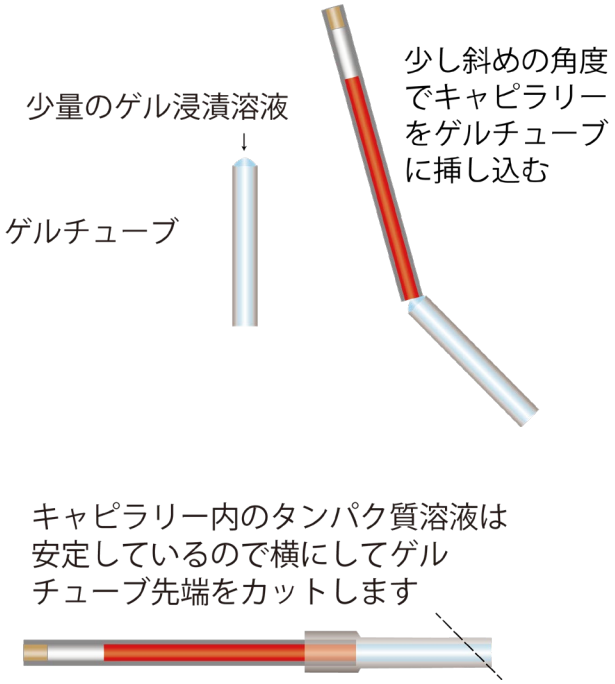

図 3.7. ゲルチューブの取付けと先端のカット

4. キャピラリーの保管

リザーバ溶液の入ったラウンドチューブにキャピラリーを静かに入れ蓋をします。所定の温度環境に、ゲル端を下にして縦置きで静置します。多くの場合、結晶化試薬を含むリザーバ溶液は、キャピラリー充填溶液よりも比重が大きいです。このためゲルチューブ側を下にして静置すると、リザーバ溶液のキャピラリー中への拡散によって、キャピラリーの下側ほど比重が大きくなり、キャピラリー中の溶液が密度差で移動することが抑えられます。その結果、微小重力環境での溶液拡散抑制と似た効果が期待でき、より良好な品質の結晶が得られます。

なお、観察時にはキャピラリーを横にする必要がありますが、短時間であれば影響はありません。

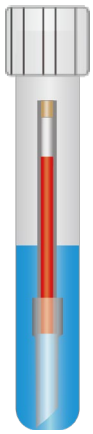

図 3.8. キャピラリーの縦置き保管

3.3. 透析法による結晶作成のセットアップ

3.3.1. ご用意いただくもの （結晶化 1 条件、LCDM 容器 1 本分として）

試料・溶液	容量	説明
LCDM 充填溶液	～27 μL	LCDM 容器に充填するタンパク質試料溶液です。 内径 1.95 mm ですので、必要量は試料長 9 mm (容器内上端にエアーを 1 mm 程度残す) の場合、約 27 μL です。充填作業のやり易さを考慮し、やや多めの準備が望ましいです。
リザーバ溶液	1 mL 程度	LCDM 容器のゲルチューブを介してキャピラリー中に拡散して、タンパク質を結晶化させる溶液です。結晶化試薬成分、バッファ成分だけでなく、必要に応じてリガンド成分などを加えます。

キットから使うもの	数量	説明
LCDM 容器 (φ1.95mm×18 mm)	1	一端にゲルチューブが接続されています。
C-Cap	1	LCDM 容器端に取り付けるキャップです。
シーリングコンパウンド	1	
極細ゲルローディングチップ	1	LCDM 容器に溶液を充填する際に使用します。
ラウンドチューブ (5 mL)	1	充填した LCDM 容器の結晶化観察用です。

ご準備いただきたい器材	数量	説明
マイクロピペット／チップ各種	各 1	リザーバ溶液　調製、充填用。
マイクロピペット （20 μL 用）	1	LCDM 容器に溶液を充填する際に使用します。
サージカルブレード (またはカッター)	1	ゲルチューブ下端カット用。刃先が鋭利なこと。

3.3.2. LCDM 容器の pre-soaking (数日前)

1. LCDM 容器を浸漬する溶液の準備

C-Kit Ground Pro ND 中の LCDM 容器は、0.04% NaN_3 溶液に浸漬した状態になっており、イオン強度が低くなっています。そのため、そのまま使用することによって、タンパク質試料に急激な塩濃度変化をあたえ、悪影響が出ることが懸念されます。また、LCDM のゲルチューブ中を結晶化試薬が拡散するには時間を要します。そこで早めの結晶生成を期待する場合には、LCDM 容器を事前にリザーバ溶液と同組成の溶液に浸漬します。緩和な条件での結晶化では、バッファ成分だけ、またはそれに必要量の結晶化試薬成分を加えた溶液とします。これらの溶液をご準備いただいた蓋つき容器に 4 mL 程度入れ、LCDM 容器を浸漬します。LCDM 容器の上端部の構造が安定するので、ゲルチューブ部分だけではなく LCDM 容器全体を浸漬します。

2. LCDM 容器の浸漬に要する時間

シミュレーション結果から、LCDM 容器の浸漬日数は、NaCl 溶液で 1 日程度、PEG4000 溶液で 2 週間程度です。

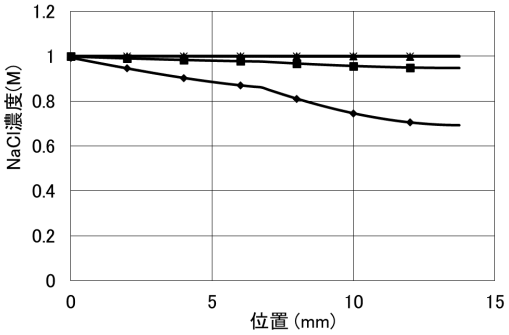

図 3.9. LCDM 容器を 1 M NaCl 溶液に浸漬したときの、内部の NaCl 濃度の時間変化のシミュレーション結果。横軸はゲルチューブの端からの距離。横軸 14 mm は透析膜の位置。縦軸は NaCl 濃度。曲線は、下から、0.5、1、2 日後の NaCl 濃度を示す。

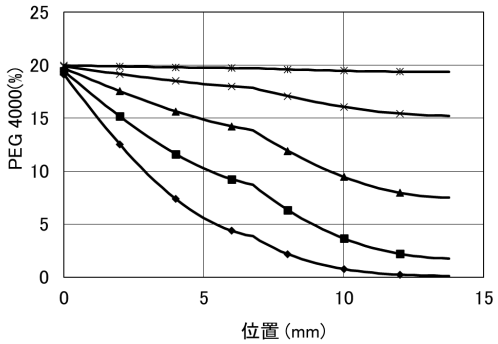

図 3.10. 20% PEG4000 溶液に LCDM 容器を浸漬したときの、内部の PEG4000 濃度の時間変化のシミュレーション結果。横軸はゲルチューブの端からの距離。横軸 14 mm は透析膜の位置。縦軸は PEG4000 濃度。曲線は、下から、1、2、4、8、16 日後の PEG4000 濃度を示す。

3.3.3. 事前準備 (充填前)

1. LCDM 充填溶液の準備

充填に必要な量のタンパク質試料溶液を準備します。充填時にリガンドなどを混合する必要がある場合には、あらかじめ混合して、LCDM 充填溶液とします。

3.3.4. 充填作業

1. LCDM 容器の準備

リザーバ溶液などに浸漬していた LCDM 容器を取り出します。LCDM 容器内に水分がある場合は、ゲルローディングチップで吸い取り、除去します。

2. LCDM 容器への充填

極細ゲルローディングチップを 20 μL マイクロピペットに取り付け、LCDM 容器に LCDM 充填溶液を充填します。LCDM 容器内上端に 1 mm 程度以上のエアーを残すようにします。この場合の試料量は約 27 μL です。

図 3.11. LCDM 容器への充填

3. LCDM 容器の封止と C-Cap の取付け

LCDM 容器上端をシーリングコンパウンドで封止します。

次に、LCDM 容器端に大きな浸透圧が加わらないよう、C-Cap を取り付けます。C-Cap の斜めに切れている側にキャピラリーを差し込みます。C-Cap 内には、樹脂製の栓がありますので、それを一緒に押し込みます。このとき、反対側の端から栓が出ないよう指で押さえておきます。樹脂製の栓が C-Cap の反対側の先端まで押し込まれたら、取付け完了です。

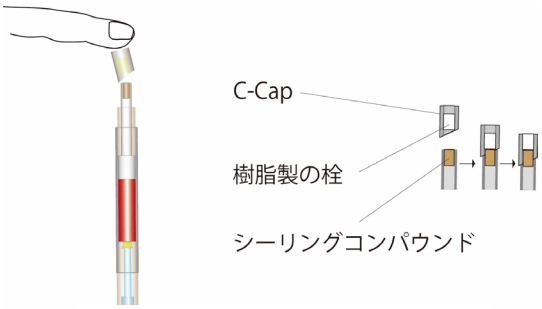

図 3.12. C-Cap の取付け

4. ゲルチューブ先端のカット

LCDM 容器に取り付けられているゲルチューブの下端を、鋭利なカッターで斜めにカットします。これにより、ゲル端が容器に密着した場合でも、リザーバ溶液の拡散が妨げられません。

図 3.13. ゲルチューブ先端のカット

5.　キャピラリーの保管

LCDM 容器のゲルチューブ側を下にして、リザーバ溶液の入ったラウンドチューブに静かに入れ蓋をします。所定の温度環境に、縦置きで静置します。多くの場合、結晶化試薬を含むリザーバ溶液は、タンパク質試料を含む LCDM 充填溶液よりも比重が大きいです。このため LCDM 容器のゲルチューブ側を下にして縦置き静置すると、結晶化試薬溶液の拡散に際して、下側ほど比重が大きくなり、LCDM 容器中の溶液が密度差で移動することが抑えられます。その結果、微小重力環境での溶液拡散抑制と似た効果が生じ、より良好な品質の結晶が得られることが期待できます。

なお、観察時には LCDM 容器を横にする必要がありますが、短時間であれば影響はありません。

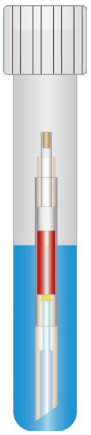

図 3.14. LCDM 容器の保管

3.4. LCDM 容器からの結晶取出し

単結晶が石英キャピラリー中の良好な場所に 1 個あるような場合には、キャピラリー中の溶液をゲルローディングチップで吸引除去し、直接中性子回折実験に供することが可能です。しかし、場合によっては結晶を取り出す必要があります。以下はその際の説明です。

また、CD 法のキャピラリーからの結晶取り出しをされたい方は、**C-Kit Ground Pro XRD**、CRT101-1 の、取扱説明書中の「3.3. CD 法キャピラリーからの結晶取り出し」の記述をご参考ください (http://www.confsci.co.jp/images/C-kit%20Ground%20Pro%20XRD%20torisetsu(221020).pdf)。

3.4.1. ハーベスト溶液の準備

結晶の品質を劣化させずに結晶を取出すには、取出した結晶を保管する溶液の組成を、LCDM 容器中の結晶がある位置の溶液組成と揃えておく必要があります。LCDM 容器中の溶液組成は容器中の場所による違いは大きくないですが、充填後の時間により異なります。LCDM 容器中の結晶化試薬濃度は、塩類を拡散させている場合で平衡に達するまでに 1 か月程度、PEG 類の場合には数か月以上かかります(「4.1. 溶液成分濃度の時間経過」)。このため、平衡に達する以前に結晶を取り出そうとする場合には、LCDM 容器中の結晶化試薬とほぼ同じ濃度の結晶化試薬成分を含むハーベスト溶液を予測し、準備する必要があります。もし濃度が合っていない場合には、取出した結晶が溶解、あるいは浸透圧差で破損するおそれがあります。

濃度の予測には、「4.1.溶液成分濃度の時間経過」の記述をご参考ください。またより確実な結晶の取出しのためには、予測濃度の上下数種類の溶液を準備することをお勧めします。準備したハーベスト溶液は、くぼみガラスのくぼみに入れておきます。

3.4.2. LCDM 容器の分解

LCDM 容器の C-Cap 側の細いキャピラリーは、過度に力を加えないように注意しながら、引き抜くことで外せます。ゲルチューブ側の細いキャピラリーは透析膜がついていて外せませんので、LCDM 容器の端をダイヤモンドやすりでカット(破断)します。

3.4.3. 結晶の取出し

くぼみガラスにハーベスト溶液を適量載せたのち、両端を壊した LCDM 容器をくぼみガラスのハーベスト溶液の中に浸漬し、ピンセットで保持します。別売の逆作動ピンセットつきスタンドを用いると、簡単に保持できます。

(http://www.confsci.co.jp/images/C-Kit%20Pro%20Advanced%20Tool_2208_2.pdf) 実体顕微鏡で観察しながら、固定した LCDM 容器の中に向けて C-Cap 側から、ハーベスト溶液を流します。結晶周辺にピペッティングによる溶液の流れを加え、結晶をキャピラリー中から、ハーベスト溶液に流し出します。開口部の大きい破断した側に流しだすことをお勧めします。

結晶によっては LCDM 容器のガラス面に固着している場合があります。このような場合には、先端が細く鋭くないもの、例えば極細ゲルローディングチップ（QSP 124-R204）などで慎重に触って動かしてみます。最終的には、結晶周辺にピペッティングによる溶液の流れを加え、溶液の流れで結晶をキャピラリー中から、ハーベスト溶液に流し出します。

結晶取出しの操作手順は、リゾチームの結晶を CD 法で作成して習熟されることをお勧めします。リゾチームは容器内面に固着しやすく、操作を習熟するのに適しています。

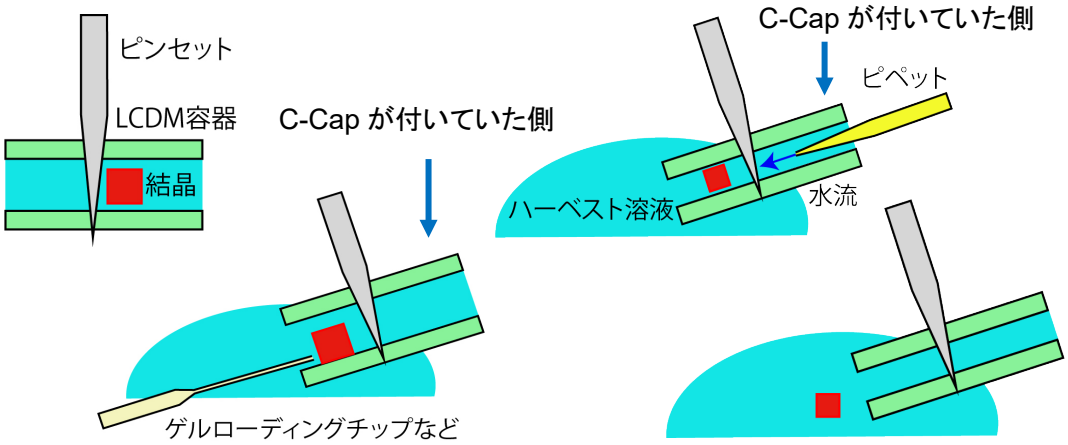

図 3.15. LCDM 容器からの結晶の取出し

上左： 実体顕微鏡で観察しながら、LCDM 容器をピンセットで固定します。

上右： ピペッティングで溶液を送って、ハーベト溶液中に流し出します。

下左： LCDM 容器に結晶が固着しているときは、ゲルローディングチップなどで触って、動かします。開口部の大きい破断した側が触り易いです。

下右： ハーベスト溶液中に結晶を流し出したところ。

4. 技術資料

4.1. 溶液成分濃度の時間経過

タンパク質の結晶化は、タンパク質試料の濃度と結晶化試薬の濃度が適切な組み合わせになった時に期待できます。確実な結晶作成のためには、CD 法キャピラリー中や LCDM 容器中のタンパク質濃度と結晶化試薬濃度の時間経過を把握することが重要です。

4.1.1. CD 法

キャピラリー中の結晶化試薬濃度の時間変化は、1 次元の拡散シミュレーションで予測できます。別売のシミュレーションプログラムでは、様々な条件での予測計算が出来ます(C-Kit Pro Advanced Tool、http://www.confsci.co.jp/images/C-Kit%20Pro%20Advanced%20Tool_2208_2.pdf)。以下では、代表的な試薬として NaCl のケースについての計算例を示します。

計算例 1

タンパク質試料:キャピラリーに 40 mm 充填

リザーバ溶液:1 M NaCl 溶液

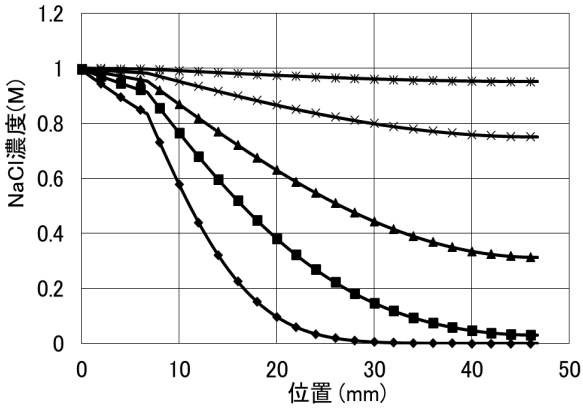

図 4.1. 計算例 1 の結果。◆、■、▲、×、Ж は、充填後 0.25、1、3、8、16 日後の値。縦軸 NaCl 濃度、横軸ゲルチューブ端からの位置

キャピラリー中の NaCl 濃度は 16 日でほぼ平衡に達します。塩類としてよく使われる硫安も、拡散係数が NaCl とほぼ同じですので、時間経過はほぼ同じになります。

4.1.2. 透析法

計算例 2

タンパク質試料:LCDM 容器に 9 mm (27 μL)充填

リザーバ溶液:1 M NaCl 溶液

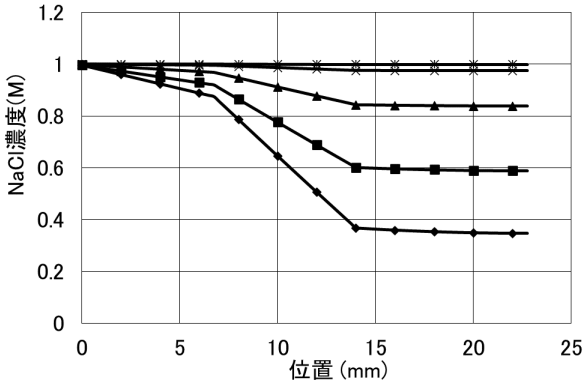

図 4.2. 計算例 2 の結果。◆、■、▲、×、Ж は充填後 4、8、16、32、64 日後の値。縦軸 NaCl 濃度、横軸はゲルチューブ端からの位置。14 mm から右側は、LCDM 容器の中に相当する。

LCDM 容器中の NaCl 濃度は 32 日でほぼ平衡に達します。塩類としてよく使われる硫安も、拡散係数が NaCl とほぼ同じですので、時間経過はほぼ同じになります。一方、LCDM 容器中の透析膜は MWCO 6,000-8,000 ですが、弊社での実測ではそれ以下の分子量である PEG4000 でも透過は非常にゆっくりです。分子量が大きく粘性の高い PEG は結晶化試薬として有用ですが、透析法を用いる場合には、結晶作成に数か月といった長期間が必要となります。その場合には、透析膜を透過できない成分 (高分子量の PEG など)をあらかじめタンパク質試料に加えて、LCDM 充填溶液として用意されることをお勧めします。

4.2. 大型結晶作成に必要な考え方

4.2.1. 必要試料量

大型結晶を作成するには多くのタンパク質試料を必要としますが、その量は以下の様に見積ることが出来ます。

簡単のため、結晶を 1 辺が a mm の立方体とします。すると、この立方体中には以下の個数のタンパク質分子が存在することになります。V_m は Matthews Coefficient、M は分子量です。

$$\frac{a^3}{1000 \times V_m \times M \times 10^{-24}} \quad (1)$$

モル数にしますと以下のようになります。

$$\frac{a^3}{V_m \times M \times 6.02 \times 10^2} \quad (2)$$

質量(g)にすると以下のようになります。

$$\frac{a^3}{V_m \times 6.02 \times 10^2} \quad (3)$$

タンパク質試料溶液の濃度を C mg/mL、溶解度を C_e mg/mL とすると、必要な溶液量(μL)は以下のようになります。

$$\frac{a^3 \times 1660}{V_m \times (C - C_e)} \quad (4)$$

例えば、リゾチーム（PDB: 3IJV）の場合に当てはめると V_m=1.84、仮に結晶の大きさを 1 mm^3、試料溶液の濃度を 35 mg/mL、溶解度を 4 mg/mL とすると、必要な溶液量は約 29.1 μL となります。αアミラーゼ（PDB: 6TAA）の場合、V_m=2.18 なので、他の条件が同じとすると 24.6 μL です。

4.2.2. 結晶の個数

前項で見積もったタンパク質試料は、結晶 1 個分についてです。大型の結晶を目指す場合、結晶が複数個出来てしまうと、それぞれの大きさが複数個分の 1 になりかねません。一方、タンパク質結晶の核形成確率は図 4.3.の様に、あるタンパク質濃度以上で、概ね直線的に増加します (リゾチームの例)[5)]。この依存性をもとに、結晶化容器の容量を 30 μL、時間を 24 時間とした場合の核形成確率を計算すると、タンパク質試料濃度 10, 15, 20, 25 mg/mL に対して、5.9, 32.8, 62.5, 91.9 になります。このことは得られる結晶の個数に対し、タンパク質濃度の影響が大きいことを示しています。

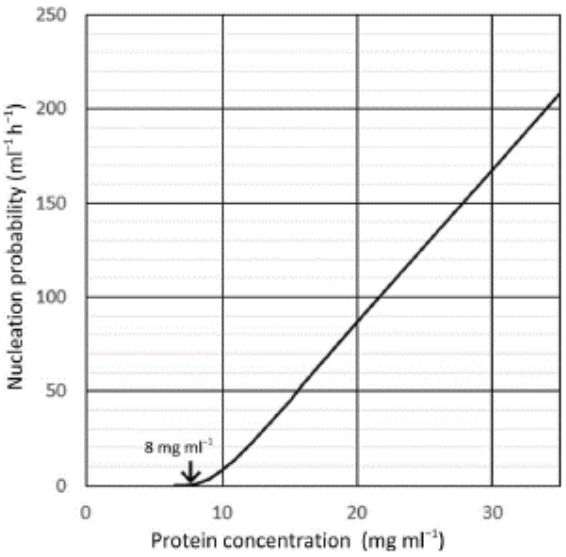

図 4.3. リゾチーム結晶化での核形成確率の試料濃度依存性 [5)]
リゾチームを 0.4 M NaCl、15% PEG4000、50 mM 酢酸バッファ (pH 4.5) 20 ℃で結晶化した際の結晶生成観察結果をもとに、核形成理論の各種パラメタを推定し、核形成確率のタンパク質濃度依存性を推定した結果を示す。

原理的には、1 個目の結晶が核形成して成長することで容器内のタンパク質試料濃度が低下し、核形成確率が低下するために 2 個目の結晶が得られないようなタンパク質濃度条件を設定することは可能です。しかし、このような結晶化のためには、低濃度の大容量の試料を用いた長時間のインキュベーションが必要で、かつタンパク質試料の濃度設定がかなり微妙なことが予想されます [5)]。

5) Nakamura, H.; Takahashi, S.; Inaka, K.; Tanaka, H. Semi-empirical model to estimate ideal conditions for the growth of large protein crystals. *Acta Cryst.* 2020, D76, 1174–1183.

4.2.3. 条件検討の考え方

以上から、大型結晶作成のための条件検討の手順は以下のようにお勧めします。

1. 概略の把握

タンパク質濃度を一定にし、注目する結晶化試薬成分についていくつか濃度を振って、バッチ法で結晶化をセットアップし、1～2 週間程度経過観察します。結晶が得られない最高濃度と、結晶が得られた最低濃度を把握します。例えば、図 4.3.のケースでは、NaCl 濃度を 100 mM～1000 mMくらいの範囲で、100 mM 刻みで検討します。

2. 核形成確率の結晶化試薬濃度依存性の把握

前項の実験で、結晶が得られなかった最高濃度から、結晶が得られた最低濃度までの間を細かく刻んで、1 個目の結晶を生成させる領域付近での核形成確率をバッチ法で検討します。この際は、結晶化試薬濃度は細かく 6 点くらい振り、他の条件

は固定します。例えば、NaCl 濃度を 300、320、340、360、380、400 mM といった具合です。

3. カウンターディフュージョン法（CD 法）による確認

この推定濃度が妥当かどうか、CD 法を用いて小スケールで確認します。その濃度条件の領域を十分時間をかけて結晶化試薬濃度が上昇していくように、CD 法で結晶化をセットアップして経過観察します。想定よりも結晶が早くでき、個数も多い場合には結晶化試薬濃度を少し下げてセットします。逆の場合は、少し高めてセットします。

4. 透析法での確認

CD 法で、良好な時間経過で結晶生成が確認できたら、LCDM 容器での結晶化を試みます。「4.1. 溶液成分濃度の時間経過」から分かる様に、CD 法キャピラリーと LCDM 容器の中の結晶化試薬濃度上昇の時間経過差は倍程度です。まず、CD 法のままの条件で透析法を試みます。

4.2.4. 複数の結晶化試薬成分があるとき

多くの場合、タンパク質試料の結晶化に用いるリザーバ溶液は、(1)高濃度の主たる結晶化試薬成分、(2)低濃度の従たる結晶化試薬成分、ならびに(3)バッファ成分から構成されます。(1)の例としては、数 M の硫安とか、数十%の濃度の PEG 類などが相当します。(2)の例としては、数十～数百 mM の NaCl などが相当します。前項で説明した核形成確率は、主たる結晶化試薬成分の濃度だけでなく、従たる結晶化試薬成分の濃度にも依存します。

結晶の数を制御するという観点からは、濃度変化に対して核形成確率の変化が緩やかな結晶化試薬成分の濃度を変化させる方が、条件設定がしやすいと考えられます。そこで、主たる結晶化試薬(例えば硫安)だけでなく、他の従たる結晶化試薬(例えば NaCl)について、その結晶化試薬成分の濃度だけを変化させ、バッチ法で結晶生成数を確認します。この結果から、濃度の変化に対して結晶数の変化が緩やかな結晶化試薬成分を見つけます。

CD 法での結晶化検討では、濃度を固定する結晶化試薬成分(例えば PEG とバッファ)を予めタンパク質試料に添加し、リザーバ溶液にはそれらに変化させる結晶化試薬成分(例えば NaCl)を加えた条件で、結晶化を検討します。予想通りの結晶化が確認できた後、LCDM 容器での結晶化にスケールアップします。

主たる結晶化試薬が PEG 類の場合、LCDM 容器では分子量の大きな PEG は透析膜を通りません（「4.1. 溶液成分濃度の時間経過」）。そこで、PEG を最初からタンパク質試料に添加し、従たる結晶化試薬濃度を検討するという方法が必須となります。

4.2.5. 濃度依存性が逆のケース

従たる結晶化試薬成分の濃度を高めていくと、一旦は核形成確率が増加するものの、ある一定濃度以上では沈殿等を一切生じないにもかかわらず、核形成確率が減少していくケースがあります。(例えば PEG を主たる結晶化試薬成分として NaCl 50 mM では多数の結晶が得られるが、150 mM では全く得られなくなるなど。) そのようなケースでは、最初にその成分を高濃度含む結晶化試薬(例えば PEG、バッファと NaCl 150 mM を含む溶液)をタンパク質試料に添加しておき、リザーバ溶液にはその成分濃度を結晶がより生じやすい低濃度溶液(例えば PEG、バッファと NaCl 50 mM を含む溶液)として、CD 法、ならびに透析法で結晶化を試みることが出来ます。このように、ある特定の成分だけ濃度を低下させるような結晶化実験は、CD 法ならびに透析法ならではの条件設定です。

4.2.6. タンパク質試料の品質

これまで説明してきたような考え方で結晶化条件を検討し最適化する場合には、核形成が特定の結晶化条件に対して再現性良く同じ確率で生じ、かつ結晶化試薬成分の濃度変化に対して素直な挙動を示すことが重要です。このためには、溶液中でのタンパク質分子が良好に単分子分散していて、かつ均一な状態であることが重要です。経時変化などで試料が若干変性して、多量体が生じている場合などでは、これが核となって結晶生成を促進するため核形成確率を制御することが困難となります。試料が良好かどうかは、以下の指標で判断可能です。

- SDS-PAGE で目的の分子量のところにシングルバンドとなっている。
- イオン交換クロマトグラフィーでシングルピーク。かつ溶出時の NaCl グラジエントの濃度が電荷密度計算値と概ね整合すること。
- Native-PAGE でシングルバンド。移動距離が電荷数に概ね整合すること。
- Dynamic Light Scattering で単分散 (分子量の整数倍の粒径)でピーク幅が適度に狭いこと。

なお核形成確率は試料の調製ロットでばらつく可能性がありますので、同一ロットでバッチ法での条件検討から、LCDM 容器の結晶化までできることが望ましく、十分量の試料準備をお勧めします。

また、高難度なタンパク質の結晶化につきましては、別途メールや Web でのご相談を受けさせていただきます。どうぞよろしくご活用ください。**C-Kit Ground Pro e-mail support** (CRT101-3), **C-Kit Ground Pro video support** (CRT101-4)、(http://www.confsci.co.jp/images/C-kit%20Ground%20Pro_220908E.pdf)

© 2022 Confocal Science Inc.